

# トランスフォーミング活性をもつ癌関連遺伝子の解析

著者	田平 知子
号	308
発行年	1990
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15412">http://hdl.handle.net/10097/15412</a>

氏 名（本籍）                    田            平            知            子

学 位 の 種 類                    薬            学            博            士

学 位 記 番 号                    薬            第            3 0 8            号

学位授与年月日                    平 成   2   年   6   月   27   日

学位授与の要件                    学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目            トランスフォーミング活性をもつ癌関連遺伝子の  
解析

（主 査）  
論文審査委員    教授 橋 本 嘉 幸    教授 鈴 木 康 男  
教授 大 内 和 雄

## 論文内容要旨

細胞の癌化は遺伝子上の何らかの変異により引き起こされる。このことは、DNA に障害を与える化学物質や放射線により癌化が起ること、癌化した細胞の形質は細胞分裂後も維持されること、癌細胞で染色体異常が見い出されること、ある種の癌は遺伝すること等から類推されてきた。癌関連遺伝子としては、細胞のトランスフォーメーションを誘発する優性なトランスフォーミング遺伝子と、その遺伝子が欠失あるいは不活性化することにより細胞を癌化させる癌抑制遺伝子が考えられる。NIH3T3細胞を用いた DNA トランスフェクション法は前者を検出するために有効な方法である。

本研究の前半では、化学発癌剤で誘発されたラットの線維肉腫及びヒト大腸癌患者組織の DNA により誘発された NIH3T3細胞のトランスフォーマントで活性化している遺伝子の解析を行った（第2章～第4章）。

後半では、このようなトランスフェクションの系により検出された癌遺伝子、*ret* 及び *ret-II* の proto-type である *ret proto-oncogene* (*proto-ret*) の生理的機能を調べる手掛かりとして、mRNA の発現パターンをラット各種組織で検討した。また cDNA クローニングにより mRNA の構造を解析した（第5章、第6章）。

第2章では、強い変異原物質である 1,8-dinitropyrene を皮下注射することにより生じた線維肉腫における *c-Ki-ras* の活性化を検討した。7例の腫瘍のうち1例の DNA により誘発されたトランスフォーマントが活性化 *c-Ki-ras* を含むことがサザンブロット解析の結果わかっていたので、この一次トランスフォーマントよりラット由来の *c-Ki-ras* 配列を遺伝子クローニングし部分構造を決定した。ラットの *c-Ki-ras* のエクソン1、2の塩基配列は、ヒトの遺伝子の対応する配列と9箇所では異なっていた。アミノ酸レベルではコドン12がヒト正常 *c-Ki-ras* 2ではグリシンをコードする GGT であるのに対し、このラット活性化 *c-Ki-ras* ではシステインをコードする TGT であるのが唯一の違いであった。コドン12は正常ラットでは GGT であることが判明し、G から T への点突然変異により *c-Ki-ras* が活性化していると推測された。7例の線維肉腫の DNA 中にこのような変異があるかどうかをオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションにより検討した結果、ラット活性化 *c-Ki-ras* を含むトランスフォーマントを誘発した腫瘍 DNA にのみ変異が検出された。

大腸癌患者の癌部及び非癌部の DNA についてもトランスフェクションにより癌遺伝子の分離・同定を試みた。得られたトランスフォーマントのうち *ras* 以外の癌遺伝子を含むと考えられるものについてさらに解析を進めた（第3章、第4章）。その結果、2人の患者の癌組織 DNA により誘発された2つのトランスフォーマント、2C-1及び SIC ではそれぞれ *c-raf-1*、*proto-ret* が活性

化しており、また別の患者の非癌部粘膜 DNA により誘発されたトランスフォーマント 7N-1 でも *c-raf-1* が活性化していた。*c-raf* はセリン・スレオニン特異的プロテインキナーゼをコードする proto-oncogene であり、一方 proto-*ret* はチロシン特異的プロテインキナーゼをコードすると考えられている。これらの活性化のメカニズムを明らかにするために、コスミドベクターを用いて遺伝子クローニングを行い遺伝子構造の変化を調べた。更に cDNA クローニングにより転写産物の構造を解明した。第 3 章では活性化 *c-raf* について解析した。ヒト正常 *c-raf-1* は 17 コのエクソンをもつが、一次トランスフォーマント 7N-1 における活性化 *c-raf-1* ではエクソン 7 と 8 の間のイントロンにおける遺伝子再配列により、5' 側半分が他の配列と置換されていた。このイントロンの再配列点近傍の DNA 配列を解析したところ、特異な二次構造が形成される可能性が示唆された。再配列点近傍の DNA 断片をプローブとしてサザンブロット解析を行った結果、別のトランスフォーマント 2C-1 の活性化 *c-raf-1* も、エクソン 7 と 8 の間のイントロンにおいて遺伝子再配列を起こしていることが明らかになった。しかし、このような遺伝子変化はトランスフェクションに用いた組織 DNA 中には検出されず、2C-1、7N-1 の活性化 *c-raf-1* の遺伝子再配列はトランスフェクションの過程で生じたものと考えられる。7N-1 の poly(A) RNA より cDNA ライブラリーを作製し活性化 *c-raf-1* mRNA の塩基配列を決定した。全長約 2.6 kb の cDNA の最初の 568 bp は未知の配列であり、それ以降の配列は *c-raf-1* のエクソン 7 から 17 に相当した。このことより未知の遺伝子と 5' 側を欠失した *c-raf-1* より融合 mRNA が転写されていることが判明した。*c-raf-1* 由来の部分は正常のものと同一のタンパク質をコードしており、またこの部分にはキナーゼ活性の発現に必須なキナーゼドメインが含まれていた。この結果より活性化には遺伝子再配列が重要であると考えられた。トランスフェクション法によりこれまで検出されている活性化 *c-raf* はすべて遺伝子再配列を起こしているが、5' 側を置換した配列には共通性が見いだされない。2C-1、7N-1 においても上流側の配列は異なっていた。従って再配列により 5' 側の領域が欠失することが *c-raf* の活性化につながると予想された。

第 4 章では結腸癌 DNA により誘発されたトランスフォーマント、SIC で活性化しているトランスフォーミング遺伝子、*ret-Ⅱ* について解析を行った。遺伝子クローニングの結果、*ret-Ⅱ* は未知の遺伝子に proto-*ret* の 3' 側の領域が融合したものであることが判明した。二次トランスフォーマント由来の cDNA を解析した結果、以下のことが明らかになった。1) *ret-Ⅱ* mRNA は、proto-*ret* mRNA のキナーゼドメインをコードする領域を保持していること。2) Proto-*ret* 由来の部分には変異はないこと。従って活性化のメカニズムは前述の *c-raf* の場合と類似している。遺伝子再配列はこの場合もトランスフェクションの過程で起きたと考えられる。*ret-Ⅱ* mRNA は 4 本のバンドとして検出されるが、そのうち 2 本に相当する 2 種類の cDNA が得られた。これらは C 末端の配列が異なる 2 種のタンパク質をコードしていた。これは第 6 章で述べ

るように *proto-ret* mRNA の 3' 側の差異による。

第6章で述べるように *proto-ret* のタンパク産物は、レセプター型チロシンキナーゼであると推定され、リガンドの結合に関与する細胞外領域、膜貫通領域（トランスメンブレンドメイン）、キナーゼドメインをその一次構造上にもつ。*ret-II* の産物においては N 末端側にある細胞外領域及び膜貫通領域が欠失している。活性化にはキナーゼ活性を制御する領域を失ったことによるキナーゼ活性の上昇と共に、細胞内局在の変化や基質の変化も関与していると推定される。活性化 *proto-ret* としては T 細胞性リンパ腫 DNA のトランスフェクションにより検出された *ret* が先に報告されている。*ret* では遺伝子再配列は膜貫通領域の上流で起きており、また上流に融合している配列も *ret-II* で融合しているものとは異なっている。従って *ret*、*ret-II* が細胞のトランスフォーメーションに果たす役割は異なっていると考えられる。

*Proto-ret* の産物は新しいクラスのレセプター型チロシンキナーゼであると考えられ、その生物的作用に興味を持たれる。第5章ではラット成体の各種組織及び受胎産物における *proto-ret* mRNA の発現をヒト *proto-ret* cDNA 断片をプローブとしてノーザンブロット解析により検討した。*Proto-ret* の発現は成体組織（脳、脾臓、胸腺、骨髄、肺、小腸、肝臓、心臓、腎臓、精巣）では低く poly(A) RNA を用いても10日間露光して検出できる程度であった。組織間で比較した場合、脳、胸腺、精巣での発現が高かった。これに対し受精後9-11日目の受胎産物（胎児、胚体外膜、胎盤を含む）では、成体の胸腺の20倍以上の mRNA が発現されていた。発現レベルは12日目以降は成体におけるものと同等になる。以上の結果より *proto-ret* の産物が、個体発生の一時期において受胎産物のある特定の組織で重要な役割を果たしている可能性が示された。

*Proto-ret* mRNA はヒト細胞株、ラット各組織において共通に4本のバンド（7.0, 6.0, 4.5, 3.9 kb）として検出される。ヒト各種細胞株のうちでは神経芽細胞腫で特異的に発現が高いが、他の細胞株では殆ど発現が検出されない。第6章では mRNA を非常に高く発現している神経芽細胞腫株 Nagai より *proto-ret* cDNA をクローニングし、その構造及びサイズの異なる4本のバンドとして検出される mRNA の生成機構を検討した。3' 側の構造が異なる4種類の cDNA が得られた。塩基配列の解析の結果、最長の cDNA、pN6 の塩基配列は、単球性白血病細胞 THP-1 由来の *proto-ret* cDNA 配列として報告のあるものと、遺伝的多型による数個の塩基置換を除いて一致した。コードされるタンパク質（1114アミノ酸）はシグナル配列、膜貫通領域となりうる疎水的領域をもち、また他のチロシンキナーゼとホモロジーをもつキナーゼドメインを膜貫通領域の下流にもっていることよりレセプター型チロシンキナーゼと考えられた。cDNA クローンのうち2種は1072アミノ酸のタンパク質をコードした。コードされる二つのタンパク質の違いは、C 末端の配列であり、1072アミノ酸のタンパク質の C 末端の9アミノ酸は、1114アミノ酸のタンパク質では異なる51アミノ酸に置換されていた。

Proto-*ret*ゲノムの3'側領域の解析の結果、mRNAが余分なスプライシングを受けることによって9アミノ酸をコードする領域が、51アミノ酸をコードする領域と置換されていることが判明した。またノーザンブロットで検出される4本のバンドは少なくとも5種のmRNAを含んでおり、それらの違いは3'末端領域におけるポリA鎖付加位置、及びスプライシングパターンの違いにより生じると推定された。

本研究により3種の異なるトランスフォーミング遺伝子が導入されたNIH3T3細胞のトランスフォーマントが得られた。これらの細胞はトランスフォーメーションに伴う細胞機能の変化を解析したり、トランスフォーメーションの阻害剤を検出するために有用である。Proto-*ret*については、mRNAの発現レベルが高い神経芽細胞腫において、どのような生理機能を果たしているのかについて現在検討を行っている。

## 審 査 結 果 の 要 旨

癌化は細胞遺伝子の変異により誘発されるが、最近、それに密接に関連する遺伝子として癌遺伝子が注目されている。本研究では前半で化学発癌剤誘発ラット線維肉腫およびヒト大腸癌組織の DNA で変異した細胞において活性化している遺伝子が解析され、後半ではその結果検出された癌遺伝子の前駆型遺伝子の生理機能を調べる手掛かりとして、対応する mRNA の発現パターン並びにその構造を解明している。

まず、ラット線維肉腫で活性化している c-Ki-ras 遺伝子の配列を決定し、その一部が対応するヒト癌遺伝子とは異なることを証明し、また、この遺伝子が活性化しているのはこの癌遺伝子の移入により癌化した細胞のみであることを明らかにした（第2章）。さらにヒト大腸癌について約30例の患者より得た検体を用いて、大腸癌において活性化されている2つの癌遺伝子（c-raf, proto-ret）を同定し、それらの塩基配列を決定した（第3章）。また、これら癌遺伝子の産物についても検討し、その機能や発現部位を明らかにした（第4～6章）。特に proto-ret 遺伝子の mRNA は正常組織では発現は低い、受精後初期での胎児には20～50倍もの高い発現があることを見いだした点、発生と癌遺伝子発現との関連を考える上で興味ある知見である。また、raf 及び ret 遺伝子の発現にはこれらの支配するタンパク質の酵素活性制御ドメインの欠失が重要であることを明らかにしたことも興味を持たれる。

以上の研究は新しい癌遺伝子の構造とその発現機構並びに発現調節機構を明らかにするなど極めて重要な知見を提供しており、博士論文に値するものと判定する。